

札幌医誌 58 (2) 137~149 (1989)

G_{M1}-gangliosidosis および Tay-Sachs 病の脳組織における 異所性糖脂質発現に関する研究

舘 睦 子

札幌医科大学小児科学講座 (主任 千葉峻三 教授)

Studies on the Occurrence of Ectopic Glycolipids in Brains with G_{M1}-gangliosidosis and Tay-Sachs Disease

Mutsuko TACHI

Department of Pediatrics, Sapporo Medical College

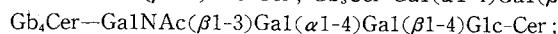
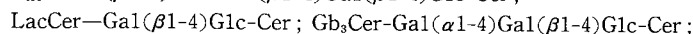
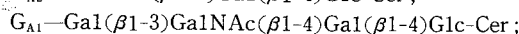
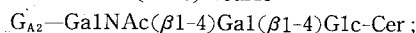
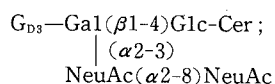
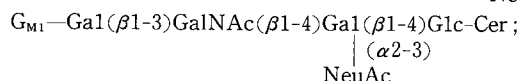
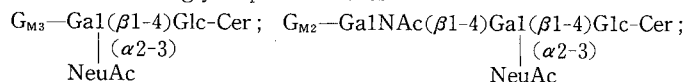
(Chief : Prof. S. Chiba)

ABSTRACT It has been demonstrated that glycolipids of the globo- and ganglioseries accumulate in brains with G_{M1}-gangliosidosis and Tay-Sachs disease (T-S dis.), although they are not detected in differentiated normal brains and cannot be explained by representative glycosidase deficiencies. The present study was undertaken to elucidate the metabolic mechanism responsible for the glycolipid accumulation in brains with these two diseases, in comparison with control human brains at different stages of differentiation. A simple method for glycosyltransferase assay using ion-exchange chromatography was developed and employed for this purpose.

1) The activity of globotriaosylceramid (Gb₃Cer) synthase was hardly detectable in unaffected embryo brains, and seemed to be a rate-limiting enzyme of the synthesis of globoseries. However, enzyme activity was detected in infants, and showed significant levels in the two diseases (3 in 4 cases of G_{M1}-gangliosidosis and all 3 cases of T-S dis.). Globotetraosylceramide (Gb₄Cer) synthase activity was low in the fetal stage and gradually increased in the normal infant. The brains with G_{M1}-gangliosidosis and T-S dis. showed similar activity as that of the infant. These results endorsed the synthetic occurrence of globoseries glycolipids in the brains of the two diseases.

2) In the normal brains, activity of gangliotriaosylceramide (Gg₃Cer) synthase was detected only in the early fetal period, while that of gangliotetraosylceramide (Gg₄Cer) synthase was very difficult to

Abbreviations and glycolipid structures.



Gal, galactose; Glc, glucose; GalNAc, N-acetylgalactosamine; NeuAc, N-acetylneuraminic acid; Cer, ceramide; C/M/W, chloroform/methanol/water; AcONH₄, ammonium acetate.

detect in developing infant brains. All G_{M1} -gangliosidosis brains showed higher levels of the two enzyme activities, expressing early embryonic level. The accumulation of Gg_4Cer in the G_{M1} -gangliosidosis brains seemed to be caused not only by catabolic β -galactosidase deficiency, but also by a higher level of Gg_4Cer synthase and sialidase which forms Gg_4Cer from G_{M1} .

3) Activities of G_{M3} , G_{M2} and G_{M1} synthases showed high levels in unaffected embryonic stage and decreased thereafter except for G_{M3} synthase. In many cases of the two gangliosidoses, higher levels of these enzymes were detected when compared to those of age-matched controls. On the other hand, although G_{D3} synthase was much less active in developing infant brains and T-S brains, the enzyme was significantly elevated in all the G_{M1} -gangliosidosis brains of the two subtypes, being characteristic of the diseased brains.

(Received January 5, 1989 and accepted January 20, 1989)

Key words: G_{M1} -gangliosidosis, Tay-Sachs disease, Glycosyltransferase, Glycolipid

1 緒 言

G_{M1} -gangliosidosis は、遺伝性の β -galactosidase 欠損に基づく複合糖質代謝異常症で、脳を主とした諸臓器に G_{M1} の蓄積が認められる¹⁾.

Jatzkewitz と Sandhoff²⁾ (1963 年) は、患者脳の分析により G_{M1} および G_{A1} の蓄積を確認しているが、ホルマリン固定標本であったため当時は評価されなかった。その後、O'Brien ら³⁾、Gonatas と Gonatas⁴⁾、Ledeen ら⁵⁾ により臓器での蓄積物質の分析が行われた結果、ガングリオンド G_{M1} であることが確認された。Okada と O'Brien⁶⁾ (1968 年) は本症の脳と内臓について β -galactosidase の欠損を証明した。その後、本症は Derry ら⁷⁾ によって、臨床的に肝脾腫、骨の異常が著明で乳児期早期に発症する I 型と、内臓・骨病変を伴わず幼児期に発症し緩徐な経過をとる II 型に分類することが提唱された。さらに、成人の神経疾患の中に β -galactosidase の欠損症例が含まれていることも報告され⁸⁻¹³⁾。現在 G_{M1} -gangliosidosis は、I 型、II 型および成人型の三型に分類されるのが一般的である。¹⁴⁾

脳における G_{M1} の蓄積量と臨床的重症度との間に相関が認められるとする報告¹⁵⁾ もあるが、必ずしもそれを支持するものばかりではない¹⁶⁾。また、 β -galactosidase の欠損程度と蓄積物質質量や臨床症状の程度は必ずしも一致しない。

患者臓器の蓄積物質を詳細に分析すると、 G_{M1} およびそのアシアロ体 (G_{A1}) に加え、 β -galactosidase の欠損のみでは説明し得ず、成人脳では検出されない“異所性”のグロボ系やガングリオ系の中性糖脂質も蓄積することがわかってきた。^{15,17,18)}

他方、 G_{M2} -gangliosidosis は β -N-acetylhexosaminidase A (β -Hex A) の遺伝的欠損であるが、酵

素学的研究が進み、現在 Table 1 のごとく分類されている。脳には多量の G_{M2} を蓄積し、古典的 Tay-Sachs 病 (以下 T-S 病) では正常の 100~300 倍にも達すると言われる²⁰⁾。本症の脳では G_{A2} および G_{D2} の蓄積もみられる。T-S 病では、 β -Hex A のイソ酵素である β -Hex B の活性はむしろ上昇している。そのため本症の脳ではグロボンドの蓄積はないとされていたが、Inagawa ら²¹⁾ によりグロボ系糖脂質も少量ではあるが確認され、 G_{M3} 、 G_{D3} の存在も報告されている²²⁾。分化した脳では内臓の主な糖脂質であるグロボ系、ガングリオ系中性糖脂質や、 G_{M3} や G_{D3} のガングリオンドは、ほとんど検出されない。したがって、Gangliosidosis 脳で検出されるこれらの糖脂質は“異所性”に発現するとみることが出来る。

しかしながら“異所性”糖脂質は、胎児期早期の脳においても存在することが見出され²³⁾、このことは脳の糖脂質発現が、分化の過程で変遷することを意味している。Gangliosidosis 脳では、グリコンダーゼの一次欠損に基づく二次的あるいは三次的な結果として脳の分化障害が起こるため、胎児期に発現される糖脂質系列が残存している可能性がある。糖鎖は遺伝子の直接の産物ではなく、糖鎖合成酵素 (糖転移酵素) を介して発現され、グリコンダーゼによって修飾される。すなわち、糖鎖合成酵素の働きによって糖鎖前駆体 (受容体) に糖ヌクレオチドから単糖が転移され一つの糖鎖結合が形成される。他方、分解は糖鎖の非還元末端から特異的グリコンダーゼによって単糖単位で解離が生じる。

本研究は、Gangliosidosis 罹患脳と病変のない末分化脳の糖鎖合成酵素とグリコンダーゼの活性を測定し、脳の分化との関連性につき検討した。このために、本研究において、Gangliosidosis 脳に認められる“異所性”

Table 1 *Nomenclature of G_{M2} -gangliosidosis.*

Common name	Clinical symptoms	Enzyme defect
Tay-Sachs disease	mental and motor deterioration muscle weakness hyperacusis macrocephaly cherry red spot	β -N-acetylhexosaminidase A (β -Hex A)
Juvenile G_{M2} -gangliosidosis	similar to Tay-Sachs disease (onset and progression more slowly)	β -Hex A (partial defect)
B1-varriant	similar to Tay-Sachs disease	β -Hex A (catalytically defect against G_{M2} and 4MU GlcNAc-6-sulfate)
AB-varriant	similar to Tay-Sachs disease	β -Hex A activator protein
Sandhoff disease	similar to Tay-Sachs disease	β -Hex A and B

糖脂質と脳固有のガングリオンドの合成酵素活性測定のため、正確で、より簡便な活性測定法を確立することを目的とした。

2 対象および方法

2.1 対 象

G_{M1} -Gangliosidosis 症例 4 例, T-S 病 症 例 3 例 の小児剖検脳を対象とした。これらの脳は分析まで -70°C で 5 年から 10 年間保存してあったものである。 G_{M1} -

gangliosidosis 症例の詳細は Table 2 に示す。古典的 T-S 病 症 例 は 死 亡 時 年 齢, 2 歳, 9 カ 月, 2 歳 10 カ 月, 3 歳 6 カ 月 の 3 症 例 を 対 象 と し た。正 常 対 照 と し て, 中 枢 神 経 病 変 の 認 め ら れ な い 3 歳, 5 歳 の 小 児 脳 と, 社 会・経 済 的 理 由 で 人 工 妊 娠 中 絶 が な さ れ た 病 変 の な い 胎 児 脳 4 例 (在 胎 齡 15 週, 22 週, 6 カ 月, 7 カ 月) を 用 い た。

Table 2 *Clinical and enzymatic findings on four cases of G_{M1} -gangliosidosis.*

	Type I		Type II	
	Case 1	Case 2	Case 3	Case 4
Clinical symptoms				
Onset age	3M	5M	12M	16M
Age at death	4Y3M	2Y9M	8Y3M	11Y2M
Abnormal facies	(+)	(+)	(-)	(-)
Cherry red spots	(+)	(-)	(-)	(-)
Hepatosplenomegaly	(++)	(+)	(-)	(-)
Bone involvement	(+++)	(+++)-(++)	(+)	(+)
Vacuolated lymphocytes	(+++)	(++)	(+)	(+)
β -Galactosidase activity ^{a)} in Leukocytes				Control range ³⁰⁾
4-MU ^{b)}	2	3	6	7.7
G_{M1} ^{c)}	0	0	0.03	0.48
				120-265
				25-54

^{a)} Activities are expressed as nmol/mg protein/hour.

^{b)} 4-MU: 4-methylumbelliferyl- β -D-galactopyranoside substrate.

^{c)} G_{M1} : G_{M1} ganglioside substrate.

2.5 μ mol ; Lubrol PX, 500 μ g ; CDP-choline, 250 nmol ; 酵素蛋白質, 200-400 μ g を含む。⁵⁴⁾ 37°C, 1 時間反応後, 200 mM の EDTA 溶液 10 μ l を加え反応を停止した。これに C/M/W (30 : 60 : 8, 以下溶媒 A) 1 ml を加え, 溶媒 A で平衡化した A-25 カラムに添加した。3 ml の溶媒 A, 2 ml の methanol でカラムを洗浄後, 6 ml の 40 mM AcONH₄ の methanol 溶液で生成脂質を液体シンチレーションカウンター用バイアルに溶出, 採取しその放射活性を測定した。

b. G_{M2} 合成酵素 (G_{M3} + UDP-GalNAc \rightarrow G_{M2} + UDP, β -N-acetylgalactosamine 転移酵素)

反応液 (50 μ l) は基質として G_{M3}, 20 nmol ; UDP-[³H] GalNAc, 50 nmol および上記の co-factors を含む。²⁹⁾ 反応と測定条件は a と同じである。

c. G_{M3} 合成酵素 (LacCer + CMP-NeuAc \rightarrow G_{M3} + CMP, シアル酸転移酵素)

反応液 (50 μ l) は, LacCer, 50 nmol ; CMP-[³H] NeuAc, 25 nmol ; MgCl₂, 250 nmol ; カコジル酸ナトリウム (pH 6.0), 2.5 μ mol ; Triton X-100, 250 μ g ; 200-400 μ g の酵素蛋白質から成る。²⁶⁾ 反応後, 1 ml の溶媒 A で反応停止し, 同溶媒で平衡化した A-25 カラムに添加し, 2 ml の methanol, 18 ml の 40 mM AcONH₄ 水溶液で順次洗浄し, 6 ml の 40 mM AcONH₄ methanol 溶液で産物の溶出を行い, 活性測定した。

d. G_{D3} 合成酵素 (G_{M3} + CMP-NeuAc \rightarrow G_{D3} + CMP, シアル酸転移酵素)

反応液 (50 μ l) は, G_{M3} (NeuAc), 50 nmol ; CMP-[³H] NeuAc, 20 nmol ; MgCl₂, 250 nmol ; カコジル酸ナトリウム (pH 6.4), 2.5 μ mol ; Triton CF-54, 150 μ g ; 酵素蛋白質, 200~400 μ g を含む。反応停止, A-25 カラムへの添加の条件は c と同様に行った後, 溶媒 A, 3 ml ; methanol, 2 ml ; 40 mM AcONH₄ 水溶液, 20 ml ; 40 mM AcONH₄ methanol 溶液, 3 ml の順にカラムを洗浄した。次いで, 40 mM AcONH₄ を含む i-propanol/n-hexane/water (55 : 20 : 19), 7 ml で液体シンチレーションバイアル中に溶出し活性測定した。

2.4 グリコシダーゼ活性測定法

β -galactosidase, β -Hex A および, B, sialidase は, それぞれの単糖の 4MU 誘導体を基質として酵素活性を測定した。¹⁴⁾

sialidase は 4MU シアル酸に加え, 生理基質として G_{M3} を用いても活性測定を行った。用いた G_{M3} は, スフィンゴシン部分を Schwarzmann の方法²⁵⁾ で ³H 標識

した。反応液 (10 μ l) は, [³H] G_{M3} (4 μ Ci/nmol) 20 nmol ; 酢酸ナトリウム (pH 4.6), 5 μ mol ; デオキシコール酸, 1 mg ; MgCl₂, 500 nmol ; 酵素蛋白質, 100-400 μ g を含む, 37°C で 2 時間反応させた後, C/M (1 : 2) 1,125 μ l を加え反応を停止する。これを溶媒 A で平衡化した A-25 カラムに添加し, 3 ml の溶媒 A で溶出した画分の放射活性を測定した。

3 成 績

3.1 糖脂質合成酵素活性測定法の確立

糖脂質合成酵素反応では, 目的とする ³H 標識の反応産物 (糖脂質) に加えて末反応の糖ヌクレオチド, 副反応により単糖-1-リン酸や遊離単糖 (CMP-NeuAc からシアル酸のリン酸エステルはできず遊離シアル酸のみ) を生ずる。従って, 反応混合液から糖脂質産物以外のこれら標識物質を反応終了後に分離除去しなければならない。各々の酵素反応について, A-25 カラムによる標識糖脂質 (反応産物) と他の標識物質との分離を検討して以下の結果を得た。

3.1.1 中性糖脂質合成酵素

① Gb₃Cer および Gg₄Cer (G_{A1}) 合成酵素

糖供与体の UDP-[³H] Gal から遊離してくる [³H] Gal をあらかじめ水により流出させた後, i-propanol により生成物 Gb₃Cer あるいは Gg₄Cer を溶出させ, それらの放射活性によって回収率を算出した。Gb₃Cer および Gg₄Cer の回収率は 90% で, 二つの糖脂質画分への他の標識物質の混在はなかった。

② Gb₄Cer および Gg₃Cer (G_{A2}) 合成酵素

i-propanol/n-hexane/water (90 : 10 : 1) の系で DEAE クロマトを行うと, Gb₄Cer や Gg₃Cer のみが溶出され, 標識された UDP-GalNAc, GalNAc-1-P, GalNAc は A-25 カラムに吸着されたまま残った。標識糖脂質の回収率は 95% であった。

3.1.2 ガングリオシド合成酵素

① G_{M1} および G_{M2} 合成酵素

酵素反応終了後, A-25 カラムによるクロマトでは副反応によって糖ヌクレオチドからできる遊離 galactose や N-acetylgalactosamine は溶媒 A と methanol による洗浄で分離, 溶出された。40 mM AcONH₄ methanol 溶液による溶出によって G_{M1} や G_{M2} のみ溶出された。反応産物 G_{M1} と G_{M2} の回収率は 97% と極めて良好であった。

② G_{M3} 合成酵素 (Fig. 2)

G_{M3} 合成反応では糖供与体 CMP-NeuAc から副反応で遊離してくる NeuAc が陰性荷電を有するため陰イ

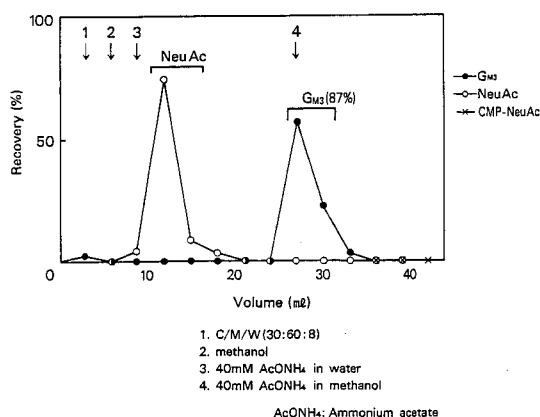


Fig. 2 Elution Profile of G_{M3} Synthase Reaction on DEAE-Sephadex A-25.

オン交換体に吸着される。そのため G_{M1} 合成酵素と同様のカラム溶出条件では、生成される G_{M3} と遊離の NeuAc が同画分に溶出されてしまう。そこでまず、AcONH₄ 水溶液で溶出を行ったところ、遊離の NeuAc のみが溶出された。その後、AcONH₄ methanol 溶液に切り替えると G_{M3} のみを溶出、回収することができた。この方法により G_{M3} の回収率は 87% であった。

③ G_{D3} 合成酵素

G_{M3} 合成酵素と同様に遊離してくる標識シアル酸を溶出させた後、40 mM AcONH₄ methanol 溶液による溶出では G_{D3} は溶出されなかった。AcONH₄ の塩濃度を上げて G_{D3} の溶出を試みたが、 G_{D3} とともに CMP-

NeuAc も溶出、混入されてしまう。そこで、溶媒を i-propanol/n-hexane/water の系に変えたところ、他の標識物質との混在がなく G_{D3} が溶出された。回収率は 96% であった。

3.2 糖脂質合成酵素とグリコシダーゼレベルについて

3.2.1 ガングリオシド合成酵素 (Fig. 3)

脳固有の糖脂質としてガングリオシドの合成酵素活性を各時期の病変のない脳と Gangliosidosis 脳について検討した。

G_{M1} 合成酵素は、病変のない脳では胎児期で活性が高く生後漸次低下し、3 歳以上では本研究で用いた方法によっては検出が困難であった。しかしながら、 G_{M1} -gangliosidosis 脳では臨床上の重症度とは直接関係なく 3 歳以上の病脳でも一定範囲の活性レベルを示した。T-S 脳についても同様であった。

G_{M2} 合成酵素は G_{M1} 合成酵素と同じような傾向を示し、胎児期脳では高く生後著減する傾向があった。 G_{M1} -gangliosidosis 脳について活性は低い、11 歳 2 カ月の症例を除く 3 例ではほぼ 3 歳児の正常脳に相当する活性レベルが認められた。T-S 脳では 3 例ともレベルは低い活性が認められた。本症における G_{M2} の蓄積は G_{M2} 合成酵素活性の亢進に基づくものではないことがわかった。

G_{M3} 合成酵素は正常では、胎児から幼児に至る脳で、ガングリオシド合成酵素としては最も活性が高いものであった。 G_{M1} -gangliosidosis 脳の 1 例を除く 3 例、

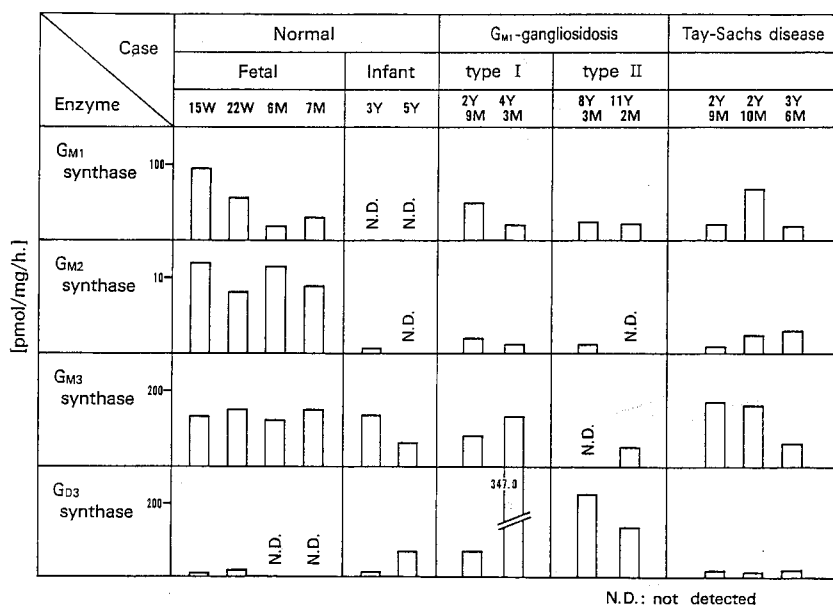


Fig. 3 Enzyme Activities of Ganglioside Synthesis.

ならびに、T-S 病では調べた 3 例のすべてがやはり高い活性レベルを示した。

G_{D3} 合成酵素は、正常の脳や T-S 病罹患脳で低いレベルであるにもかかわらず、G_{M1}-gangliosidosis の I 型、II 型ともに極めて高い活性を示した。糖脂質合成の面から、本酵素活性の亢進は G_{M1}-gangliosidosis 脳での特徴の一つであることがわかった。

3・2・2 中性糖脂質合成酵素 (Fig. 4)

分化した脳では検出し難いグロボ系とアシアロガングリオ系糖脂質の“異所性”発現について合成酵素の活性によって調べた。

① グロボ系中性糖脂質合成酵素

グロボ系糖脂質群は内臓組織の主な糖脂質であり、正常の成人脳では検出されない。本研究では Gangliosidosis 脳で出現することが知られている二つのグロボ系糖脂質の合成酵素活性を調べた。

Fig. 4 に示すように、脳の Gb₃Cer 合成酵素は Gb₄Cer 合成酵素のおよそ 100 分の 1 のレベルでありグロボ系糖脂質群合成系の律速酵素とみられる。対照脳では、胎児期には本研究で用いた方法では検出されず、生後 3 歳幼児脳の 1 例で活性が認められたのみであった。疾患脳でみると G_{M1}-gangliosidosis の 1 例では活性が検出されなかったが他の 3 例、及び T-S 病の 3 例で活性が検出された。

Gb₄Cer 合成酵素は、脳の分化に伴ってやや活性が上昇する傾向が認められた。G_{M1}-gangliosidosis および

T-S 脳では正常を上回る活性レベルを示した。

以上の結果から、Gb₃Cer 合成酵素活性レベルは極めて低いが、正常脳でもグロボ系の合成は行われており、Gangliosidosis 脳におけるグロボ系糖脂質の出現は Gb₃Cer 合成酵素の活性亢進によることが主たる要因と思われた。

② アシアロガングリオ系糖脂質合成酵素

アシアロガングリオ系の二つの合成酵素はともに低いレベルを示した。正常脳では、Gb₄Cer 合成酵素とは逆に、Gg₃Cer 合成酵素は脳の成熟につれて活性が検出されなくなった。Gg₄Cer 合成酵素は胎児、幼児脳とも測定の下限ないし検出限界以下であった。それに反し、G_{M1}-gangliosidosis 脳では、調べた全症例で年齢を問わず Gg₃Cer 合成酵素活性は比較的高く、Gg₄Cer 合成酵素も一定のレベルを示し、本症脳での二つのアシアロガングリオ系糖脂質発現を裏づけた。G_{M1}-gangliosidosis 脳での Gg₄Cer (G_{A1}) 蓄積は β -galactosidase 欠損による結果のみとはいえないと考えられた。T-S 脳では Gg₃Cer (G_{A2}) の蓄積が認められるが、Gg₃Cer 合成酵素活性は 3 例中 1 例で検出されたのみであった。Gg₄Cer 合成酵素は 3 例とも活性が検出された。

3・2・3 グリコシダーゼ (Fig. 5, Fig. 6)

β -galactosidase は当然ながら G_{M1}-gangliosidosis 脳で低値を示したが、その残存活性は臨床的な I 型と II 型との間に有意の差は認められなかった。T-S 病の脳組織において、 β -Hex A の活性は 3 例とも検出され

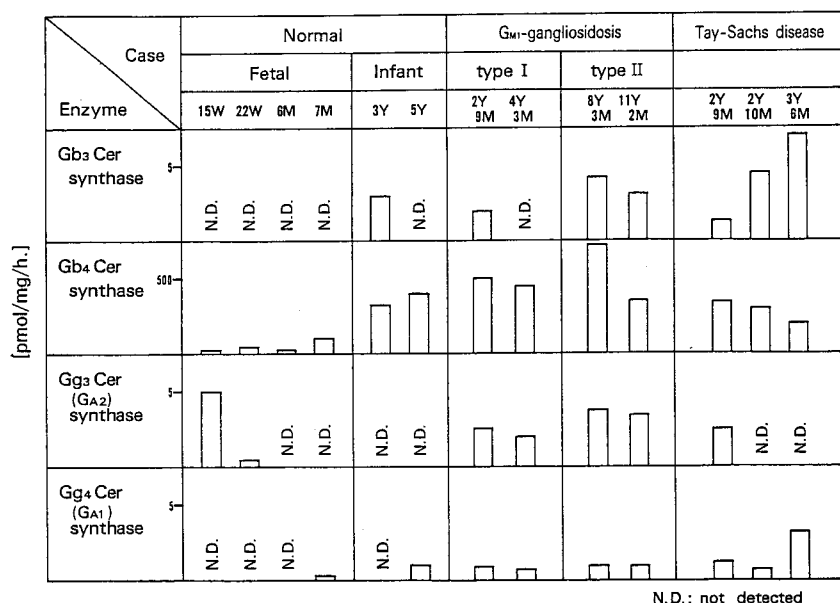


Fig. 4 Enzyme Activities of Neutral Glycolipid Synthesis.

なかったが、 β -Hex B は、従来報告されているように正常または高活性を示した。

4-MU シアル酸および G_{M3} を用いて測定した sialidase の活性は疾患脳と正常脳との間に有意の差はないが、正常脳では分化に伴い G_{M3} -sialidase 活性レベルは高くなっていた。

4 考 察

4.1 糖脂質合成酵素活性測定法

糖脂質合成酵素の活性測定は、放射性同位元素で標識された糖ヌクレオチドを糖供与体として反応させ、生成した糖脂質を分離してその放射活性を測定する方法が用いられることが多い。反応生成物の単離に関し、古くは薄紙クロマトグラフィー²⁶⁾や薄紙電気泳動²⁷⁾など煩雑な方法が多かったが、最近では特異的抗体を使って生成物を分離する方法²⁸⁾や、逆相クロマトの原理に基づくカートリッジを用いる方法²⁹⁾など簡便な方法も開発されてきた。今回の陰イオン交換クロマトを用いた方法も、より簡便で分離能が高く従来の方法に比べ十分評価され得る。本研究で確立した方法は、陰イオン交換体に吸着したガングリオシド（反応産物）と副産物を塩濃度を変えることにより分別、溶出する方法であるが、溶媒組成を変えることにより、中性糖脂質の合成反応の測定系にも有効であった。どの合成酵素反応においても生成物の回収率は90%前後と高く、種々の糖脂質合成酵素活性の測定に利用できるものである。

4.2 G_{M1} -gangliosidosis

G_{M1} -gangliosidosis I 型と II 型に関し、 β -galactosidase 活性の欠損程度と臨床的重症度との間に

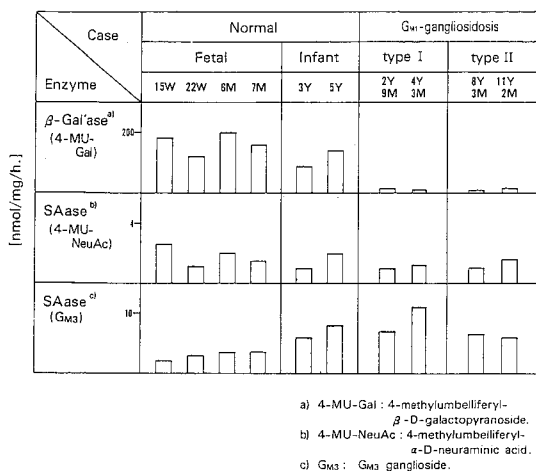
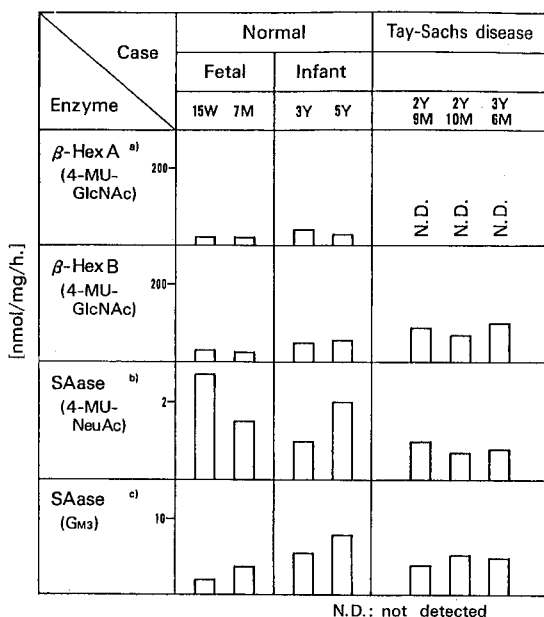


Fig. 5 Glycosidase Level in G_{M1} -gangliosidosis Brain.



- a) 4-MU-GlcNAc: 4-methylumbelliferyl- β -D-N-Acetylglucosamine
b) 4-MU-NeuAc: 4-methylumbelliferyl- α -D-neuraminic acid
c) G_{M3} : G_{M3} ganglioside

Fig. 6 Glycosidase Level in Tay-Sachs Brain.

は必ずしも相関が認められていない³⁰⁾。両型について、酵素学的差異の有無の検討は以前から行われてきており、でんぷんゲル電気泳動を用いた初期の混乱の時代の後⁷⁾、等電点電気泳動³¹⁾、熱安定性、至適 pH、などによって I 型と II 型を区別する試みがなされてきた。^{12,32-34)}

他方、 G_{M1} 蓄積量の多少が臨床症状に関与するか否かにつき、Suzuki らは、培養皮膚線維芽細胞においては G_{M1} 蓄積量と臨床型との間に相関を認めている³⁵⁾が、脳における G_{M1} およびケラタン硫酸様のムコ多糖類の蓄積量に着目し分析を行った結果では、重症度との相関は認め難いと言われている¹⁶⁾。Kasama らの報告¹⁸⁾でも同様に蓄積程度と臨床的分類との間に相関は認められないようである。これに対し当教室の Ishikawa ら¹⁵⁾は、I 型と II 型の脳の糖脂質の分析を詳細に行った結果、I 型でより多くの G_{M1} 蓄積を認める傾向があり、さらに I 型が II 型に比べ死亡年齢に比してより多量の G_{M1} 蓄積を認めていることから、蓄積速度との間に関連があることを推測している。

今回 Ishikawa らの報告^{15,17)}と同一症例を用いて糖脂質分解および合成系に関する酵素活性を調べた結果、 G_{M1} 合成酵素活性は認められたが、I 型と II 型との間に

有意の差はなく、I 型における G_{M1} 蓄積は合成系そのものが賦活化された結果とは言えなかった。ヒトを含めた数種の哺乳類の脳組織分析の結果^{34,36-40)} G_{M1} は分化の早期では主たる糖脂質であるが、分化が進むにつれて減少していく傾向が認められている。ラット脳において、LacCer 合成酵素、G_{M1} 合成酵素及び psychosin 合成酵素の 3 つの β -galactose 転移酵素活性の年齢変化を調べた Hildebrand ら⁴¹⁾ も、G_{M1} 合成酵素は出生時で最も高く、その後低下していくと報告している。本研究では、G_{M1}-gangliosidosis 脳の G_{M1} 合成酵素活性は高いレベルにあり、脳分化の末熟性を表わすと言えよう。

G_{M1}-gangliosidosis における G_{A1} の蓄積は、1963 年、Jatzkewitz の報告²⁾ 以来患者臓器の糖脂質分析により確認されている^{17,18,42)}。G_{A1} の蓄積は β -galactosidase 欠損によりその分解経路がブロックされることで説明されているが、G_{A1} は G_{M1} から sialidase によって生成されるのか、ガングリオ系中性糖脂質の合成経路によって G_{A2} から合成されるものなのかは不明である。微生物、*Arthrobacter ureafaciens* の sialidase⁵³⁾ は G_{M1} や G_{M2} のシアル酸を切るが、哺乳類ではこれらガングリオンドに働く sialidase は知られておらず、これらのアシアロ体は sialidase によって生成する可能性は以前は否定的であった。Öhman ら(1970 年)⁴⁴⁾ のヒト脳 sialidase の基質特異性の報告でも G_{M1} および G_{M2} は基質になり難いとしている。しかし、Miyagi ら⁴⁵⁾ により、3 種の sialidase のうち原形質膜由来の sialidase は、G_{M1}、G_{M2} にも働くことがラット肝について示された。この sialidase の G_{M1} や G_{M2} に対する活性は、G_{M3} や G_{D1a} の約 5~20% であった。従って G_{M1}-gangliosidosis 脳で蓄積する G_{A1} が G_{M1} に由来することは十分考えられる。本研究において、³H 標識した G_{M1} を用いて脳の sialidase 活性測定を試みたところ、患者、コントロールともに測定限界以下であったが G_{M3} に対する sialidase 活性は疾患脳で概して高く、G_{A1} の生成に寄与していると考えた。

他方、合成系については Gg₄Cer(G_{A1}) 合成酵素活性が疾患脳でのみ検出されたので、G_{A1} の蓄積は β -galactosidase 欠損に基づく G_{M1} → G_{A1} 生成系に加え、ガングリオ系中性糖脂質経路の合成系の賦活化も寄与していることが示唆された。

脳の分化に伴い、ガングリオンド群の量的変化及びその組成の変化は、ヒトや種々の哺乳動物で知られているが^{36-39,46,47)}。G_{M1}-gangliosidosis 脳では酵素欠損では説明し得ないグロボ系、ガングリオ系の中性糖脂

質が蓄積する^{15,17,18)}。グロボ系糖脂質は、主として非神経系臓器の糖脂質であり、正常小児脳や成人脳では検出されない。構成脂肪酸も非神経系のものとは異なり Gangliosidosis 脳に特徴的な組成を示した^{15,18)}。Vanier ら⁴⁸⁾ は 2~24 カ月の幼児脳の分析で微量ではあるがグロボ系糖脂質や G_{A1} の存在を示唆し、これらの構成脂肪酸は脳ガングリオンドと同様にステアリン酸が主であると述べている。幼児期早期の段階では中枢神経系でも、これらの中性糖脂質が出現することを推定している。石川らの報告¹⁵⁾ でも、対照として分析した幼児脳のうち生後 6 カ月のもので同様の中性糖脂質が分離されている。胎児期の脳における糖脂質分析の結果²³⁾ では、より年長の小児や成人とは異なりグロボ系(Gb₃Cer が中性糖脂質全体の 3%)、ガングリオ系(Gg₃Cer が 9%)の糖脂質が存在し、加えてネオラクト系糖脂質(nLc₄Cer が 13%、Le^x が 10%)も分離同定され、脳の分化に伴ってガングリオンドの変化のみならず、中性糖脂質も含めた糖脂質系列の発現が変化することが示された。従って、G_{M1}-gangliosidosis における異常な中性糖脂質の蓄積は、脳の分化が障害され未分化な脳において発現されている糖脂質系列が未だ残存している可能性を示すようにみられる。

しかし、これらの糖脂質合成酵素を測定した結果、胎児期、幼児初期の活性レベルは Gangliosidosis 脳とは同一ではなかった。Gb₃Cer と Gb₄Cer の合成酵素は疾患脳では活性が検出されたものの、対照脳でみると胎児脳では活性がなく、生後 3 歳、5 歳の幼児脳で活性が認められ必ずしも脳における糖脂質分析の結果と一致するものではなかった。Gangliosidosis の各症例の糖脂質分析の結果と比較すると、Gb₃Cer 合成酵素活性の検出されなかった 1 例はグロボ系、ガングリオ系ともに蓄積程度がそれほど著明でなく、ネオラクト系中性糖脂質などの異常な糖脂質が認められた特殊な症例である。

これに対し Gg₃Cer は疾患およびより早期の胎児期脳でのみ活性が認められ、脳の Gg₃Cer 量とよく一致していた。G_{M1} 合成酵素と同様に一連のガングリオ系合成酵素は脳分化の早期で発現され、以降低下していくものとみられる。

臨床型に関し、I 型と II 型の間に顕著な差は認められず、より早期に発症する I 型の合成酵素は胎児期の酵素活性と一致する結果ではなく、脳分化の障害は単純ではない。

哺乳動物の脳の糖脂質分析で、以前は胎児期の G_{M1} の推移につき研究されていたが、より早期においては

G_{M1} に比して G_{D3} が優位であることが報告された^{39,49)}. Yu ら⁴⁰⁾ も正常ラットで G_{M3} や G_{D3} が胎仔脳の早期において優位成分として存在し、神経細胞の発達とともに G_{M1} , G_{D1a} , G_{T1a} が優位となることに着目し、それぞれの分岐点となる G_{D3} および G_{M2} 合成酵素活性の推移を測定し糖脂質蓄積パターンと合成酵素の活性増減のパターンとがよく一致した結果を得ている⁴⁹⁻⁵¹⁾. 今回の結果では、Gangliosidosis 脳において G_{D3} 合成酵素活性が対照に比べ著しく高く、逆に G_{M2} 合成酵素が年齢相当の活性しか示さなかったことは、末だ G_{M3} から G_{D3} への合成系が残存しておりこれも脳の分化障害を表わす一現象とも考えられる。

4.3 T-S 病について

T-S 病においても G_{M2} , G_{A2} の蓄積に合成系の活性化は関与していないようである。Iwamori ら²²⁾ は、正常脳では検出されない G_{M3} , G_{D3} が少量ではあるが検出されたことは G_{M2} の大量蓄積による二次的なものと推測した。すなわち $G_{M3} \rightarrow G_{M2}$ の合成系が抑制され、 $G_{M3} \rightarrow G_{D3}$ の合成経路が賦活化されると考えられたわけであるが、本研究では T-S 脳において G_{D3} 合成酵素活性の上昇は認められなかった。

グロボ系糖脂質合成酵素活性が認められたことは、グロボ系中性糖脂質が存在することと一致するところであった。しかし、 G_{M1} -gangliosidosis の所で述べたように正常脳では幼児期に本酵素の活性が認められ、脳の糖脂質の分析結果と相反するものであった。酵素と生成産物の不一致については酵素活性を発現させないような調節機構が生体内で働くためと考えられる⁵²⁾ が、Gangliosidosis においては、この正常の調節機構に異常をきたしているものと考えられる。

ガングリオ系中性糖脂質では Gg_3Cer の合成酵素は検出されなかった(3 例中 2 例)。 Gg_3Cer 合成経路はラット肝でも確認されている⁵²⁾ が、 Gg_3Cer 合成はいかなる界面活性剤を加えても活性はごく低値で $LacCer$ に対する N-acetylgalactosamine 転移酵素の検出は難しいと言われる。同じくラット肝における研究で、Pohlentz ら⁵³⁾ は G_{M2} , Gg_3Cer および G_{D2} の合成にあずかる N-acetylgalactosamine 転移酵素は同一のものであるとしているが、今回の測定結果では G_{M2} 合成酵素活性と Gg_3Cer 合成酵素活性は必ずしも同様の傾向を示してはいなかった。

5 結 語

G_{M1} -gangliosidosis 及び T-S 病の脳組織中にはそれぞれのグリコシターゼ欠損に基づく分解の阻害では説明

し得ない糖脂質も出現する。本研究では、陰イオン交換体を用いたより簡便な糖脂質合成酵素の活性測定法を確立し、その方法を用いて両疾患脳におけるこのような糖脂質の出現を、主に糖脂質の生合成の面から調べた結果を得た。

1) グロボ系糖脂質の合成経路、 $LacCer \rightarrow Gb_3Cer \rightarrow Gb_4Cer$ に働く二つの酵素のうち、 Gb_3Cer 合成酵素は発育の異なる正常脳ではいずれも極めて活性が低く、グロボ系合成の律速段階とみられるが、 G_{M1} -gangliosidosis では 4 例中 3 例、T-S 病では 3 例全例で活性が検出された。 Gb_4Cer 合成酵素は胎児期には低く、幼児期に入ると上昇するが、 G_{M1} -gangliosidosis と T-S 病の脳では全例に幼児脳と同程度又はより高い活性を示し、グリコシターゼ活性には差はなかった。このことは、両疾患脳におけるグロボ系糖脂質の“異所的”出現を生合成の面から裏づけた。

2) アシアロガングリオ系 (Gg) の二つの合成酵素のうち Gg_3Cer 合成酵素は脳の発育とともに活性が低下するが、 G_{M1} -gangliosidosis ではどちらの合成酵素も総じて対照脳より活性が高かった。本疾患脳および胎児期における $Gg_3Cer(G_{A2})$ の出現は Gg_3Cer 合成酵素の活性の残存によることが示唆された。又、本症脳での $Gg_4Cer(G_{A1})$ の蓄積は先天性の分解過程の欠損によるのみならず、合成の亢進ならびに、sialidase 亢進による G_{M1} からの生成も寄与しているとみられた。

3) 脳のガングリオシド合成酵素は G_{M3} 合成酵素が最も高く、 G_{M1} , G_{M2} 合成酵素の順に低くなった。これら三つの酵素活性は胎児期で高く漸次低下する。 G_{M1} -gangliosidosis および T-S 病では、対照幼児脳より高い活性レベルを示した。

4) G_{D3} 合成酵素は対照脳や T-S 病罹患脳では低いレベルであるのに対し、 G_{M1} -gangliosidosis 脳は I 型、II 型を問わず高い活性を示し、合成面における新たな特徴であった。

稿を終えるにあたり、本研究に御指導、御校閲頂きました札幌医科大学小児科学講座 千葉峻三教授、北海道大学癌研究所生化学部門 牧田 章教授及び、国立療養所八雲病院院長 南 良二博士に深謝致します。

なお本研究の一部は第 30 回日本先天代謝異常学会 (1987 年 11 月、松山) で発表した。

本研究は文部省特定研究「先天性代謝病」研究費の補助を受けた。

文 献

1. Suzuki, K.: Gangliosides and disease: A Review. *Adv. Exp. Med. Biol.* **174**, 407-418 (1984).
2. Jatzkewitz, H. and Sandhoff, K.: On a biochemically special form of infantile amourotic idiocy. *Biochim. Biophys. Acta* **70**, 354-356 (1963).
3. O'Brien, J. S., Stern, M. B., Landing, B. H., O'Brien, J. K. and Donnell, G. N.: Generalized gangliosidosis. *Am. J. Dis. Child.* **109**, 338-346 (1965).
4. Gonatas, N. K. and Gonatas, J.: Ultrastructural and biochemical observations on a case of systemic late infantile lipidosis and its relationship to Tay-Sachs disease and gargoylism. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **24**, 318-340 (1965).
5. Ledeen, R., Salsman, K., Gonatas, J. and Taghavy, A.: Structure comparison of the major monosialogangliosides from brains of normal human, gargoylism, and late infantile systemic lipidosis. Part I. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **24**, 341-346 (1965).
6. Okada, S. and O'Brien, J. S.: Generalized gangliosidosis: Beta-galactosidase deficiency. *Science* **160**, 1002-1004 (1968).
7. Derry, D. M., Fawcett, J. S., Andermann, F. and Wolfe, L. S.: Late infantile lipidosis. *Neurology (Minneapolis)* **18**, 340-348 (1968).
8. Mutoh, T., Sobue, I., Naoi, M., Matsuoka, Y., Kiuchi, K. and Sugimura, K.: A family with β -galactosidase deficiency: Three adults with atypical clinical patterns. *Neurology* **36**, 54-59 (1986).
9. Mutoh, T., Naoi, M., Takahashi, A., Hoshino, M., Nagai, Y. and Nagatsu, T.: Atypical adult G_{M1}-gangliosidosis: Biochemical comparison with other forms of primary β -galactosidase deficiency. *Neurology* **36**, 1237-1241 (1986).
10. Stevenson, R. E., Taylor, H. A. and Parks, S. E.: β -galactosidase deficiency: Prolonged survival in a child with Hurler-like features but without neurological abnormalities. *Clin. Genet.* **14**, 16-23 (1978).
11. Suzuki, Y., Nakamura, N., Fukuoka, K., Shimada, Y. and Uono, M.: β -galactosidase deficiency in juvenile and adult patients. *Hum. Genet.* **36**, 219-229 (1977).
12. O'Brien, J. S. and Norden, A. G. W.: Nature of the mutation in adult β -galactosidase deficient patients. *Am. J. Hum. Genet.* **29**, 184-190 (1977).
13. Wenger, D. A., Sattler, M., Mueller, O. T., Myers, G. G., Schneiman, R. S. and Nixon, G. W.: Adult G_{M1}-gangliosidosis: Clinical and biochemical studies on two patients and comparison to other patients called variant or adult G_{M1}-gangliosidosis. *Clin. Genet.* **17**, 323-334 (1980).
14. Suzuki, K.: Enzymatic diagnosis of sphingolipidoses. *Methods Enzymol.* **138**, 727-762 (1987).
15. 石川幸辰: G_{M1}-gangliosidosis の脳組織における糖脂質の Heterogeneity に関する研究. *札幌医誌* **53**, 747-766 (1984).
16. Suzuki, Y., Crocker, A. C. and Suzuki, K.: G_{M1}-gangliosidosis. Correlation of clinical and biochemical data. *Arch. Neurol.* **24**, 58-64 (1971).
17. Ishikawa, Y., Makita, A. and Minami, R.: Characterization of neutral and acidic glycosphingolipids in brains of two patients with G_{M1}-gangliosidosis typel and type2. *J. Neurochem.* **44**, 1100-1106 (1985).
18. Kasama, T. and Taketomi, T.: Abnormalities of cerebral lipids in G_{M1}-gangliosidosis, infantile, juvenile, and chronic type. *Jpn. J. Exp. Med.* **56**, 1-11 (1986).
19. 鈴木邦彦: スフィンゴリビド-シス A: スフィンゴリビド-シス概説, B: β -N-アセチルヘキソサミンダーゼ A および B 異常症. *蛋白質 核酸 酵素* **33**, 718-727 (1988).
20. O'Brien, J. S.: The gangliosidoses, In: Stanbury J. B., Wyngaarden J. B. and Fredrickson D. S.: The metabolic basis of inherited disease. 945-969, McGraw-Hill, New York. (1983).
21. Inagawa, A., Makita, A., Gasa, S. and Arashima, S.: Characterization of neutral glycolipids in Tay-Sachs brain. *J. Neurochem.* **33**, 369-375 (1979).
22. Iwamori, M. and Nagai, Y.: Ganglioside-composition of brain in Tay-Sachs disease: Increased of G_{D2} and N-acetyl- β -D-galactosaminyl G_{D1a} ganglioside. *J. Neurochem.* **32**, 767-777 (1979).
23. Ishikawa, Y., Gasa, S., Minami, R. and Makita, A.: Characterization of neutral glycosphingolipids from fetal human brain: Evidence for stage-specific expression of the globo, ganglio, and neolacto series in the central nervous system. *J. Biochem.* **101**, 1369-1375 (1987).
24. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J.: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-

- 275 (1951).
25. Schwarzmann, G.: A simple and novel method for tritium labeling of gangliosides and other sphingolipids. **Biochim. Biophys. Acta** **529**, 106-114 (1978).
26. Richardson, C. L., Keenan, T. W. and Morre, D. J.: Characterization of CMP-N-Acetylneuraminic acid: lactosylceramide sialyltransferase in golgi apparatus from rat liver. **Biochim. Biophys. Acta** **488**, 88-96 (1977).
27. Kaufman, B. and Basu, S.: Embryonic chicken brain sialyl-transferases. **Methods Enzymol.** **8**, 365-368 (1966).
28. Taniguchi, N., Yokosawa, N., Gasa, S. and Makita, A.: UDP-N-acetylgalactosamine: globoside α -3-N-acetylgalactosaminyltransferase. **J. Biol. Chem.** **257**, 10631-10637 (1982).
29. Hashimoto, Y., Abe, M., Kiuchi, Y., Suzuki, A. and Yamakawa, T.: Genetically regulated expression of UDP-N-acetylgalactosamine: G_{M3} (NeuGc) N-acetylgalactosaminyltransferase [EC2.4.1.92] activity in mouse liver. **J. Biochem.** **95**, 1543-1549 (1984).
30. 菊地浩一: G_{M1} -gangliosidosis の Heterogeneity に関する研究. **札幌医誌** **49**, 462-473 (1980).
31. Farrell, D. F. and MacMartin, M. P.: G_{M1} gangliosidosis: Enzymatic variation in a single family. **Ann. Neurol.** **9**, 232-236 (1981).
32. Mutoh, T., Naoi, M., Nagatsu, T., Takahashi, A., Matsuoka, Y., Hashizume, Y. and Fujiki, N.: Purification and characterization of human liver β -galactosidase from a patient with the adult form of G_{M1} -gangliosidosis and a normal control. **Biochim. Biophys. Acta** **964**, 244-253 (1988).
33. Tanaka, H. and Suzuki, K.: Lactosylceramide β -galactosidase in human sphingolipidoses. **J. Biol. Chem.** **250**, 2324-2332 (1975).
34. Irwin, L. N. and Irwin, C. C.: Developmental changes in ganglioside composition of hippocampus, retina, and optic tectum. **Dev. Neurosci.** **2**, 129-138 (1979).
35. Suzuki, Y., Nakamura, N. and Fukuoaka, K.: G_{M1} -gangliosidosis: Accumulation of ganglioside G_{M1} in cultured skin fibroblasts and correlation with clinical types. **Hum. Genet.** **43**, 127-131 (1978).
36. Vanier, M. T., Holm, H., Öhman, R. and Svennerholm, L.: Developmental profiles of gangliosides in human and rat brain. **J. Neurochem.** **18**, 581-592 (1971).
37. Suzuki, K.: The pattern of mammalian brain gangliosides-III. **J. Neurochem.** **12**, 969-979 (1965).
38. Merat, A. and Dickerson, J. W. T.: The effect of development on the gangliosides of rat and pig brain. **J. Neurochem.** **20**, 873-880 (1973).
39. Irwin, L. N., Michael, D. B. and Irwin, C. C.: Ganglioside patterns of fetal rat and mouse brain. **J. Neurochem.** **34**, 1527-1530 (1980).
40. Yu, R. K., Macala, L. J., Taki, T., Weinfeld, H. M. and Yu, F. S.: Developmental changes in ganglioside composition and synthesis in embryonic rat brain. **J. Neurochem.** **50**, 1825-1829 (1988).
41. Hildebrand, J., Stoffyn, P. and Hauser, G.: Biosynthesis of lactosylceramide by rat brain preparations and comparison with the formation of ganglioside G_{M1} and psychosine during development. **J. Neurochem.** **17**, 403-411 (1970).
42. Suzuki, K. and Chen, G. C.: Brain ceramide hexosides in Tay-Sachs disease and generalized gangliosidosis (G_{M1} -gangliosidosis). **J. Lipid Res.** **8**, 105-113 (1967).
43. Saito, M., Sugano, K. and Nagai, Y.: Action of *Arthrobacter ureafaciens* sialidase on sialoglycolipid substrates. **J. Biol. Chem.** **254**, 7845-7854 (1979).
44. Öhman, R., Rosenberg, A. and Svennerholm, L.: Human brain sialidase. **Biochemistry** **9**, 3774-3782 (1970).
45. Miyagi, T. and Tsuiki, S.: Evidence of sialidase hydrolyzing gangliosides G_{M2} and G_{M1} in rat liver plasma membrane. **FEBS Lett.** **206**, 223-228 (1986).
46. Svennerholm, L.: The distribution of lipids in the human nervous system-I. Analytical procedure. Lipids of foetal and newborn brain. **J. Neurochem.** **11**, 839-853 (1964).
47. Månsson, J. E., Vanier, M. T. and Svennerholm, L.: Changes in the fatty acid and sphingosine composition of the major gangliosides of human brain age. **J. Neurochem.** **30**, 273-275 (1978).
48. Vanier, M. T., Holm, M., Månsson, J. E. and Svennerholm, L.: The distribution of lipids in the human nervous system-V. **J. Neurochem.** **21**, 1375-1384 (1973).
49. Maccioni, H. J. F., Panzetta, P., Arrieta, D. and Caputto, R.: Ganglioside glycosyltransferase activities in the cerebral hemispheres from developing rat embryos. **Int. J. Dev. Neurosci.** **2**, 13-19 (1984).
50. Panzetta, P., Maccioni, H. J. F. and Caputto, R.: Synthesis of retinal gangliosides during chick

- embryonic development. **J. Neurochem.** **35**, 100-108 (1980).
51. Chou, K. H., Nolan, C. E. and Jungalwala, F. B.: Composition and metabolism of gangliosides in rat peripheral nervous system during development. **J. Neurochem.** **39**, 1547-1558 (1982).
52. Pohlentz, G., Klein, D., Schmitz, D., Schwarzmann, G., Katalinić, J. P. and Sandhoff, K.: Biosynthesis of gangliosides from asialogangliosides in rat liver golgi vesicles. **Biol. Chem. Hoppe-Seyler** **369**, 55-63 (1988).
53. Pohlentz, G., Klein, D., Schwarzmann, G., Schmitz, D. and Sandhoff, K.: Both G_{A2} , G_{M2} , and G_{D2} syntheses are single enzymes in golgi vesicles from rat liver. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **85**, 7044-7048 (1988).
54. Honke, K., Taniguchi, N. and Makita, A.: A radioimmune assay of ganglioside G_{M1} synthase using cholera toxin. **Anal. Biochem.** **155**, 395-399 (1986).

別刷請求先:

(〒060) 札幌市中央区南1条西16丁目

札幌医科大学小児科学講座 舘 睦子